

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 836 884 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
22.04.1998 Patentblatt 1998/17

(51) Int. Cl.⁶: **B01L 3/00**, **B01L 7/00**
// C12Q1/68

(21) Anmeldenummer: 97118138.3

(22) Anmeldetag: 18.10.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE
Benannte Erstattungsstaaten:
AL LT LV RO SI

(71) Anmelder:
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder: Bienhaus, Gerhard, Dr.
82407 Wielenbach (DE)

(30) Priorität: 21.10.1996 DE 19643320

(54) System zur kontaminationsfreien Bearbeitung von thermischen Reaktionsprozessen

(57) Ein System mit Zweikomponentendichtung aus einem inneren flüssigkeitsdichten Dichtelement (2) mit einer Öffnung (4) und einem äußeren, druckdichten Dichtelement (3) und einem Reaktionsgefäß (1) ist

besonders geeignet zum Transport von Flüssigkeiten in einem solchen System sowie Temperaturbehandlungen in ihm.

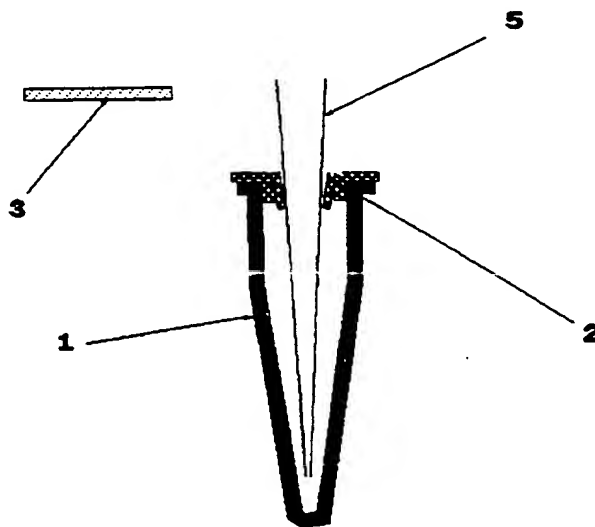


Abb. 3

EP 0 836 884 A2

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein System zur kontaminationsfreien Bearbeitung von thermischen Reaktionsprozessen sowie ein Verfahren zur Durchführung von Flüssigkeitstransportprozessen in Gefäße hinein und aus Gefäßen heraus.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in analytischen Verfahren verwendet werden, bei denen Verfälschungen durch Ein- oder Austrag von Störsubstanzen stattfinden können. Besonders zur Durchführung molekular diagnostischer Analysen mit Probenvorbereitung (Sample preparation) und Amplifikation (z. B. PCR gemäß EP-B-0 201 184) werden aufgrund der Kontaminationsproblematik verschlossene Reaktionsgefäße benötigt. Bei einer automatischen Durchführung einer solchen Analyse müssen diese Gefäße jedoch mehrmals geöffnet und geschlossen werden. Weiterhin werden bei diesem Prozeß Temperaturen von 4 - 95 °C angewendet, die erhöhte Anforderungen an die Verschlusssicherheit der Gefäße stellen.

In WO 95/11083 wird besonders für die PCR ein Reaktionsgefäß mit geschlossenem Septum beschrieben, das sich jedoch nur für die automatische Entnahme aus einem Reaktionsgefäß, nicht jedoch für die automatische Beschickung, eignet. Zur Beschickung des Gefäßes mit der Probe muß der Schnappdeckel vollständig manuell geöffnet werden. Darüber hinaus ist diese Ausführungsform nur bedingt für die Verwendung von Einmalpipettenspitzen einsetzbar, da zum Durchstoßen des Septums eine erhebliche Kraft benötigt wird, die übliche Kunststoffpipettenspitzen nicht aufbringen können. Darüber hinaus läßt sich eine gewünschte Deckelgegenheizung wegen der thermischen Labilität des Septums nur bedingt anwenden. Beide Effekte laufen parallel, d. h. je dünner das Septum, desto leichter durchsetzbar, desto höher die Thermolabilität.

In EP-A-O 642 828 ist ein System mit gleichen Komponenten beschrieben, welches dieselben Nachteile aufweist.

In WO 83/01912 ist ein Gefäß zur Bestimmung von Hämoglobin mit Hilfe von Kaliumcyanid beschrieben, welches einen ersten Stopfen mit einem Kanal und einen Deckel zur Vermeidung des Austritts von gelöstem Kaliumcyanid enthält. Dieses Gefäß ist zur Durchführung von Temperaturbehandlungen nicht gedacht und geeignet.

In WO 94/05425 ist ein Deckel für einen Container beschrieben, der ein Ventil enthält, das durch Druck auf den Deckel geöffnet werden kann, so daß Flüssigkeit, die sich in dem Deckel befindet, in den Container einfließen kann.

In US-A-4,362,698 ist ein Verschuß für Probengefäße beschrieben, der aus zwei Teilelementen besteht, die jedoch weder druckdicht schließen, noch ohne Vernichtung ihrer Funktion vom Probengefäß und voneinander getrennt werden können.

In DE-A-44 12 286 ist ein System mit Deckel, Reak-

tionsgefäß und Deckelhandler beschrieben, das ein vollständig automatisierbares Abarbeiten eines solchen Prozesses ermöglicht. Es hat allerdings den Nachteil, daß eine zusätzliche Gerätekomponekte als Deckelhandler benötigt wird. Dies gilt auch für die in DE 29505707 beschriebene Ausführungsform. Weiterhin sind diese Ausführungsformen durch den separaten Deckelöffnungsmechanismus langsam.

US-5,282,543 beschreibt eine Verdeckelung von Reaktionsröhrchen, wobei die Verschlüsse als ein einzelnes Dichtelement in einem Verbund angeordnet sind. Diese Anordnung ist für ein direktes, automatisches Pipettieren in die Reaktionsgefäße ungeeignet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein System zu Verfügung zu stellen, in dem der Flüssigkeitstransport mit Hilfe üblicher Kunststoffpipettenspitzen vorgenommen werden kann, und welches dennoch einen so dichten Verschuß der Gefäße ermöglicht, daß von der Flüssigkeit im Innern der Gefäße beim Erhitzen keine störende Menge nach außen dringen kann.

Kernstück der vorliegenden Erfindung ist eine 2-Komponenten-Dichtung auf einem Reaktionsgefäß, wobei ein erstes, inneres Dichtelement das Gefäß flüssigkeitsdicht, aber nicht druckdicht, und ein abnehmbares zweites, äußeres Dichtelement das Gefäß druckdicht verschließt.

- Fig. 1 Ablaufschema eines Pipettiervorgangs mit den erfindungsgemäßen Elementen
- Fig. 2 Reaktionsgefäß mit den Dichtelementen
- Fig. 3 Reaktionsgefäß mit Dichtelementen und eingeführter Pipettenspitze
- Fig. 4 Anordnung in einem Heizblock mit Deckelgegenheizblock
- Fig. 5 Device zum Arretieren mehrerer Reaktionsgefäße und beweglichem Dichtelement 2
- Fig. 6 Anordnung des Device in Abb. 5 in einem Heizblock mit Deckelgegenheizblock
- Fig. 7 Formen der Öffnungen im Dichtelement 1
- Fig. 8 Ausführungsform für Verbindung von Dichtelement 1 mit Reaktionsgefäß
- Fig. 9 Obenaufsicht einer Vorrichtung enthaltend 16 Reaktionsgefäße
- Fig. 10 Querschnitt/Seitenansicht einer Vorrichtung gemäß Abb. 9 verbunden über Kunststoffstegen
- Fig. 11 Obenaufsicht eines Mehrfachdichtelements für die Vorrichtung gemäß Abb. 9
- Fig. 12 Querschnitt/Seitenansicht eines Mehrfachdichtelements
- Fig. 13 Seitenansicht eines in einen Automaten eingelegten Mehrfachelements gemäß Fig. 5

Gegenstand der Erfindung ist ein System zur Bearbeitung von thermischen Reaktionsprozessen in Flüssigkeiten, enthaltend eine Vielzahl von Gefäßen, eine Vielzahl von ersten Verschlüssen für einzelne dieser Gefäße und einen oder mehrere zweite Verschlüsse,

die eine Vielzahl von Gefäßen gleichzeitig verschließen können. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Transport einer Flüssigkeit in ein Gefäß oder aus einem Gefäß, welches mit einem ersten und zweiten Dichtelement verschlossen ist, hinein bzw. heraus mit Hilfe einer Pipettiereinheit.

Unter einem Reaktionsgefäß im Sinne der Erfindung wird ein Gefäß (1) verstanden, in welchem eine Flüssigkeit aufbewahrt werden kann. Es ist daher verschließbar oder verschlossen. Das Gefäß hat jedoch mindestens eine Öffnung, welche mit dem ersten und zweiten Verschuß verschlossen werden kann. Darüber hinaus weist das Gefäß bevorzugt keine nicht flüssigkeits- und druckdicht verschlossene oder verschließbare Öffnung auf. Das Gefäß ist darüber hinaus bevorzugt thermostabil, insbesondere im Hinblick auf Form und Inertheit gegenüber der aufzubewahrenden Flüssigkeit, insbesondere bei Temperaturen bis zu 110 °C. Bevorzugte Materialien für Reaktionsgefäße sind bevorzugt thermisch-formbare Kunststoffe, wie Polystyrol, Polyethylen oder Polypropylen. Sie können mit Hilfe der Spritzgußtechnologie auf einfache Weise hergestellt werden. Sie sind insbesondere zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Ein besonders geeignetes Material für Gefäße ist Polypropylen, da es Temperaturen bis 110 °C ohne Deformationen toleriert. Das Reaktionsgefäß weist bevorzugt eine besonders dünne Wandstärke auf, bevorzugt zwischen 0,15 und 0,45 mm, besonders bevorzugt ca. 0,3 mm, und hat bevorzugt eine konische Form, die nach unten hin verjüngt ist. Die Gefäße fassen bevorzugt ein Volumen von zwischen 0,05 und 50 ml, bevorzugt 0,2 bis 2 ml. Die äußere Form des Gefäßes wird meist bestimmt durch die Tatsache, daß es einer Temperiereinheit, z. B. einem Kitzblock, in der Form möglichst gut angepaßt ist. Dies verbessert den Wärmedurchgang von der Temperiereinheit durch die Wand des Gefäßes in das Innere des Gefäßes und die gegebenenfalls darin befindliche Flüssigkeit. Solche Reaktionsgefäße sind kommerziell erhältlich.

Mehrere Reaktionsgefäße können auch miteinander verbunden sein. So hat es sich beispielsweise als zweckmäßig erwiesen, 16 Reaktionsgefäße, die mit geschwungenen Stegen in zwei Reihen zu je 8 Positionen miteinander verbunden sind, einzusetzen. Die Gefäße sind bevorzugt so miteinander verbunden, daß sie in übliche Thermocycler, z. B. für die Durchführung einer PCR, passen. Mehrere dieser zusammengeführten Gefäße können nebeneinander behandelt werden, z. B. im 96-Well-Mikrotitrationsplattenformat. Wenn im folgenden von einer Vielzahl von Gefäßen gesprochen wird, so handelt es sich bevorzugt um 4 bis 96, besonders bevorzugt 8 bis 16 Gefäße.

Ein innerer Verschuß (Dichtelement 2) für dieses Gefäß hat die Funktion, den ungewollten Austritt von Flüssigkeiten aus der Öffnung des Gefäßes zu verhindern. Bevorzugt ist der innere Verschuß aus einem elastischen Dichtmaterial hergestellt, z. B. Latex oder Silikonkautschuk. Die Härte des Materials beträgt

bevorzugt 20 bis 100 shore, bevorzugt 30 bis 60 shore. Als besonders bevorzugtes Material wurde Elastosil LR 3003/40 (Wacker Chemie GmbH, BRD) eingesetzt, das eine Elastizität von 40 shore besitzt. Der innere Verschuß hat eine Dicke von 0,1 bis 20 mm, besonders bevorzugt 0,5 bis 1,2 mm. Dies ist so zu verstehen, daß diese Dicke sich auf die nach außen hin dünnste Stelle bezieht. So sind z. B. zur Gesamtversteifung des Verschlusses oder zur Anpassung des Dichtelements an die Öffnung des Gefäßes (z. B. als Dichtring 15) am Band größere Dicken möglich. Zur Erleichterung des Einführens einer Pipettiereinheit, z. B. einer Kunststoffpipettenspitze, ist in dem inneren Verschuß eine weitere Verdünnung oder eine Öffnung (4) vorgesehen. Diese Öffnung kann unterschiedliche geometrische Formen aufweisen (siehe Fig. 7a - 7d). So kann z. B. ein Schlitz mit einer Länge von 1 bis 15 mm, bevorzugt 1 bis 10 mm, vorgesehen werden. Es ist auch möglich, die Öffnung als Kreuzschlitz oder in Sternform vorzusehen. Wichtig ist, daß die Öffnung so verschlossen ist, daß keine Flüssigkeit von selbst nach außen treten kann. Solche Schlitzöffnungen können beispielsweise mit Messern in den ersten Verschuß geschnitten oder gestanzt werden. Sie können gewünschtenfalls auch schon während des Gießprozesses als Ausnehmungen freigehalten werden.

Bei dem inneren Verschuß handelt es sich um einen Verschuß, der für jedes Gefäß getrennt aufgesetzt werden kann (Einzelverschuß). Es ist jedoch ein Mehrfachverschuß entsprechend der Anzahl der Reaktionsgefäße möglich. Die Fixierung des Mehrfachverschlusses (2) erfolgt über Paßelement am Reaktionsgefäß oder/und dem Verschuß, bevorzugt aber über Dichtringe (15) des Verschlusses, der in die Öffnung des Gefäßes (1) hineinragt. Der innere Verschuß verbleibt bevorzugt auf dem Gefäß und verschließt das Gefäß während des gesamten Behandlungsvorgangs und wird bevorzugt auch danach nicht entfernt. Der innere Verschuß überdeckt bevorzugt die gesamte Öffnung und besonders bevorzugt auch die oberen Kanten des Gefäßes, kann jedoch auch teilweise in das Gefäß eingeführt sein. Bevorzugt ist der innere Verschuß nicht druckdicht.

Ein äußerer Verschuß (Dichtelement 3) soll dazu dienen, eventuell gewollt oder ungewollt erzeugte Undichtigkeiten im inneren Verschuß nach außen hin druckdicht abzudichten. Er überdeckt daher auf alle Fälle alle Öffnungen im inneren Verschuß, die beispielsweise als Schlitz schon vorgeformt waren oder (mit Hilfe der Pipettierspitze) erzeugt wurden. Dieser äußere Verschuß kann prinzipiell aus beliebigen Materialien bestehen, wenn sie sich nur fest genug auf die Gefäßöffnung oder/und den inneren Verschuß aufpressen lassen. Bevorzugt sind daher für den äußeren Verschuß wiederum elastische Materialien, wie sie oben für den ersten Verschuß beschrieben waren. Da der äußere Verschuß nicht für das Vorsehen oder die Erzeugung einer Öffnung geeignet sein muß, bevorzugt

nicht von der Pipettiereinheit durchstoßen werden muß, sind im Hinblick auf die Dicke größere Grenzen möglich, insbesondere nach oben. Allerdings sind Dicken von mehr als 20 mm dann unzweckmäßig, wenn eine separate Deckelheizung vorgesehen werden soll. Bevorzugte Dicken liegen zwischen 0,1 und 10 mm. Die Deckelheizung, welche die Verdampfung eventuell sich am inneren Verschuß niederschlagenden Kondenswassers bewirken soll, kann in den äußeren Verschuß integriert sein. Die Deckelheizung kann jedoch auch in einem unabhängigen Bauelement untergebracht sein. Besonders bevorzugt ist der Fall, daß der äußere Verschuß als eine dünne, ablösbare Schicht aus elastischem Dichtmaterial, z. B. eine Matte, auf einem beheizbaren Bauelement vorgesehen wird, welches in seiner Gesamtheit auf das Reaktionsgefäß mit dem ersten Verschuß aufgedrückt wird. Der äußere Verschuß ist bevorzugt für den Verschuß einer Vielzahl von Gefäßen gleichzeitig geeignet, z. B. von 4 bis 96, bevorzugt 8 bis 16, solcher Gefäße (entsprechend der Anzahl Gefäße oder inneren Verschlüsse). Ein Merkmal eines besonders bevorzugten äußeren Verschlusses ist es, daß er vollständig vom inneren Verschuß getrennt werden kann. Dies geschieht, wenn eine Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipettiereinheit durch den inneren Verschuß in das Gefäß hinein oder aus dem Gefäß heraus transportiert werden soll. Für diesen Vorgang wird der äußere Verschuß vom Gefäß und dem inneren Verschuß entfernt, so daß die Pipettiernadel beim Durchtritt durch die Öffnung des inneren Verschlusses nicht durch den äußeren Verschuß durchtreten muß.

Flüssigkeitsdicht im Sinne der Erfindung bedeutet insbesondere, daß Flüssigkeiten nicht ohne Einwirkung zusätzlicher Kräfte, wie Druck (z. B. durch Erhitzen) oder bewußte Erzeugung oder Weitung einer Öffnung austreten können.

Druckdicht bedeutet, daß der Verschuß Drucke bis zu 2,5 bar, bevorzugt bis zu 1,2 bar, aushält, ohne Gas oder Flüssigkeit aus eingeschlossenem Raum z. B. dem Gefäß, austreten zu lassen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Transport einer Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipettiereinheit in ein Gefäß oder aus einem Gefäß, welches mit einem ersten und zweiten Verschuß verschlossen ist, enthaltend die Schritte Entfernung eines äußeren Dichtelements (3) von dem Gefäß und einem inneren Dichtelement (2), Einführung der Pipettiereinheit in das Gefäß durch das innere Dichtelement (2) und Aufnahme der Flüssigkeit in die Pipetten aus dem Gefäß oder Abgabe der Flüssigkeit aus der Pipettiereinheit in das Gefäß.

Flüssigkeiten, die transportiert werden können, sind beispielsweise Probenflüssigkeiten oder davon abgeleitete Flüssigkeiten, in denen die Anwesenheit von Inhaltsstoffen nachgewiesen werden soll, z. B. Serum, buffy coat, Plasma und davon abgeleitete Flüssigkeiten, Flüssigkeiten, die Resultat eines Nukleinsäureamplifikationsverfahrens sind, aber auch

Flüssigkeiten, die Reagenzien zum Nachweis, zur Vorbereitung oder Amplifikation von Inhaltsstoffen von Probenflüssigkeiten enthalten.

Unter einer Pipettiereinheit wird ein Gerät oder eine Vorrichtung verstanden, in welche Flüssigkeit aufgenommen und wieder abgegeben werden kann. Dies geschieht bevorzugt durch Einsaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit in einen Aufnahmebereich der Pipettiereinheit. Dies können prinzipiell auch wiederverwertbare Aufnahmeeinheiten, wie Metallnadeln, sein. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung ist jedoch die Verwendung von Kunststoffpipettenspitzen (5), die nur einmal zum Flüssigkeitstransport verwendet werden. Diese sind üblicherweise aus Materialien, z. B. Polypropylen, die eine mechanische Belastung nur sehr begrenzt aushalten. Ferner sind sie nicht sehr spitz, so daß ein selbständiges Durchstoßen von herkömmlichen Deckeln mit ihnen nicht möglich ist. Aus diesem Grund ist es im Sinne der Erfindung bevorzugt, wenn der innere Verschuß eine vorgestanzte Öffnung, z. B. in Form eines Schlitzes, aufweist.

Die Einführung der Pipettiereinheit in das Gefäß durch den inneren Verschuß wird bevorzugt automatisch vorgenommen, z. B. mit Hilfe eines handelsüblichen Pipettierautomaten. Prinzipiell ist jedoch auch die manuelle Bearbeitung der Einführung der Pipettiereinheit möglich, z. B. mit einer Handpipette. Hierbei wird die Öffnung im inneren Verschuß, z. B. die Schlitzes, so weit erweitert, daß die Pipettiereinheit durch den Verschuß ins Innere des Gefäßes eindringen kann.

Als weiteren Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird entweder eine bereits in dem Gefäß befindliche Flüssigkeit in die Pipettiereinheit aufgenommen oder eine in der Pipettiereinheit enthaltene Flüssigkeit in das Gefäß abgegeben. So ist beispielsweise möglich, Reagenzien für die Durchführung einer Reaktion in dem Gefäß zu einer Probenflüssigkeit zuzugeben. Es ist jedoch auch möglich, einer bereits bearbeiteten Probenflüssigkeit eine bestimmte Menge zu entnehmen und in die Pipettiereinheit aufzunehmen.

Besondere Vorteile hat das erfindungsgemäße System in Verfahren, bei denen eine Flüssigkeit in dem Gefäß erhitzt werden soll. Während Heizschritten ist das Gefäß bevorzugt sowohl durch den inneren als auch den äußeren Verschuß verschlossen, so daß praktisch weder Flüssigkeit noch Gas aus dem Gefäß entweichen können. Dazu wird der äußere Verschuß mit einer bestimmten Kraft abhängig von der Anzahl der Reaktionsgefäße niedergehalten. Diese Kraft beträgt 0,1 bis 10 N pro Reaktionsgefäß, bevorzugt 1 bis 5 N. Dieser Druck wird bevorzugt durch vertikales Aufdrücken des Verschlusses, z. B. mit einer Halterung (12), wie einer Metalplatte, die auch die Deckelheizung enthalten kann, erzeugt. Hierzu ist es bevorzugt, die Halterung möglichst gleichmäßig und senkrecht in Richtung des Gefäßverschlusses zu bewegen. Für den Fall des Einsatzes von Mehrfachvorrichtungen ist der gleichzeitige Verschuß aller Gefäße unter gleichen Andruckver-

hältnissen bevorzugt. Für diesen Fall verhindert der äußere Verschuß das Ausdringen von gasförmigen Flüssigkeitsbestandteilen (z. B. Wasserdampf oder Aerosolen) in die Umgebung außerhalb des Gefäßes, entgegen dem Gasdruck. Verfahren, bei denen die Flüssigkeit im Inneren des Gefäßes mehrfach erhitzt und abgekühlt wird, sind beispielsweise die Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, z. B. der Polymerasekettenreaktion. Aber auch einfache Denaturierungen und Hybridisierungsreaktionen können Erhitzungsschritte enthalten.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Systems sind mehrere bevorzugte Ausführungsformen von Verfahren durchführbar. In einer ersten Ausführungsphase wird eine Probenflüssigkeit durch den inneren Verschuß in das Gefäß, welches dann als Reaktionsgefäß dient, einpipettiert. Ebenso werden die für die Durchführung der gewünschten Reaktion(en) erforderlichen Reagenzien entweder vorgelegt oder zu der Probenflüssigkeit zupipettiert. Während dieser Pipettierschritte ist der äußere Verschuß geöffnet, d. h. das Dichtelement (3) entfernt. Vor Durchführung von Heiz- oder/und Abkühl-schritten wird zunächst der äußere Verschuß geschlossen. Nach Beendigung der Temperaturschritte und bevorzugt nach erneuter Einstellung eines Gasdruckes im Gefäß, der dem Außendruck entspricht, kann der äußere Verschuß wieder entfernt werden. Falls gewünscht oder erforderlich, werden weitere Pipettier- oder/und Temperaturschritte ausgeführt, analog dem oben beschriebenen Vorgehen. Soll z. B. nach einem Temperaturschritt Flüssigkeit aus dem Gefäß entnommen werden, so wird nach Druckausgleich der äußere Verschuß geöffnet, die Pipettiereinheit durch den inneren Verschuß eingeführt und die gewünschte Menge an Flüssigkeit aus dem Gefäß in die Pipettiereinheit aufgenommen. Danach wird die Pipettiereinheit durch den inneren Verschuß entfernt und die Flüssigkeit wie gewünscht weitertransportiert, z. B. in eine Meßzelle (bei analytischen Verfahren) oder in ein weiteres Reaktionsgefäß.

Bevorzugt enthält das erfindungsgemäße Verfahren in einem weiteren Schritt nach Abschluß jedes Flüssigkeitstransportes durch den inneren Verschuß den Wiederverschuß des Gefäßes mit dem äußeren Verschuß. Danach können weitere Temperaturbehandlungsreaktionen durchgeführt werden.

In Fig. 1 ist das bevorzugte erfindungsgemäße Verfahren zum Transport von Flüssigkeiten schematisch gezeigt. Ein Gefäß (1) ist mit Hilfe eines inneren Verschlusses (2) verschlossen, der eine Öffnung (4), z. B. in Form eines Schlitzes, aufweist. Beim Einführen der Pipettenspitze (5) ist der äußere Verschuß (3) vom inneren Verschuß getrennt. Nach Einführen der Pipettiereinheit kann Flüssigkeit in sie hinein aufgenommen oder aus ihr heraus abgegeben werden.

Auch hierzu ist der äußere Verschuß offen. Nach Entnahme der Pipettenspitze wird das Gefäß mit Hilfe des äußeren Dichtelements (3) verschlossen und steht

zur Temperaturbehandlung zur Verfügung.

Fig. 2 zeigt ein Reaktionsgefäß, wie es in Fig. 1 eingesetzt werden kann, in Vergrößerung. Neben den bei Fig. 1 beschriebenen Elementen ist auch ein Dichtring (15) zu erkennen, der Bestandteil des inneren Verschlusses (2) ist.

Fig. 3 zeigt in Vergrößerung den Zustand, wenn eine Pipettenspitze (5) durch den inneren Verschuß (2) in das Gefäß (1) eingeführt ist. Deckel (3) ist entfernt.

Das erfindungsgemäße System läßt sich bevorzugt in Anordnungen von mehreren miteinander verbundenen Reaktionsgefäßen (1) (Fig. 4) einsetzen, wobei Dichtelement (3) dann als "Matte" für eine Reihe von Reaktionsgefäßen dient. Die Dichtelemente (2) mit Einzelöffnungen (4) können ebenfalls miteinander eine verbundene Einheit bilden. Anordnungen im 96-well Mikrotitrationsplatten-Format sind bevorzugt.

Das Dichtelement (3) ist bevorzugt, wie in Fig. 4 dargestellt, als leicht austauschbares Element des Deckelgegenheizblock (7) angeordnet. Hierzu sind Halterungen (8) für die Matte vorgesehen. Heizelement (7) mit der Matte kann mit Hilfe eines Scharniers (Drehpunkt 9) auf die Gefäße (1) geklappt werden.

Fig. 5 zeigt eine Variante der Ausführungsform. Hier ist eine Halterung (12) für die Reaktionsgefäße so ausgeformt, daß das Dichtelement (3) gleichzeitig über ein Scharnier (11) und einen Rahmen (10) integriert ist und entsprechend geöffnet werden kann, so daß dann eine Pipettierung, wie in Fig. 1 gezeigt, erfolgen kann.

Fig. 6 zeigt die Anordnung der Variante von Fig. 5 in einem Heizblock (6) mit Deckelgegenheizblock (7) und Drehpunkt (9).

Fig. 7 zeigt einige erfindungsgemäße geometrische Varianten der Öffnung (4) für das Einführen einer Pipettenspitze. 7a und 7b sind Schlitzes, in 7c und 7d sind außerdem kleine Ausnehmungen im Material enthalten.

Die Dichtelemente bestehen bevorzugt aus Silikon, das Reaktionsgefäß aus Polypropylen.

Diese Materialien sind für ihre schlechten Verbindungseigenschaften bekannt. Fig. 8 zeigt eine Möglichkeit, durch Ausbildung von Verbreiterungen (14) des Bandes der Reaktionsgefäße ("Ohren") mit entsprechenden Löchern (13) die Silikondichtung (2/nicht gezeigt) zu vernieten. Zur Dichtigkeit wird darüber hinaus der Dichtring (15/nicht gezeigt) benutzt, der in das Reaktionsgefäß hineinragt (siehe Fig. 2).

Fig. 9 und 10 zeigen Reaktionsgefäße für die Durchführung einer PCR. Es handelt sich um 16 Reaktionsgefäße, die durch geschwungene Stege in 2 Reihen mit je 8 Positionen verbunden sind. Die Stege sind so ausgeformt, daß eine höhere Temperaturbelastung keine Verformung ergibt. Die Reaktionsgefäße besitzen Verbreiterungen (Ohren) (14, siehe Fig. 8) zur Verschweißung mit dem Dichtelement (2) (siehe Fig. 11).

In Fig. 11 ist eine Matte als Dichtungselement (2) gezeigt. Sie enthält an den zu den einzelnen Gefäßen gehörigen Positionen Schlitzes (4). Über Verbreiterungen (13) kann das Dichtelement auf die Gefäßplatte

(oben) aufgeschweißt werden.

In Fig. 12 ist ein Dichtelement (2) im Schnitt dargestellt. Man erkennt die in die Gefäße hineinragenden Dichtringe (15) und die Schlitze (4) (im Längsschnitt).

In Fig. 13 ist ein Mehrfach-Device nach Fig. 5 im aufgeklappten Zustand gezeigt. Es ist möglich, z. B. über einen Barcode, auf der Klappe eine Identifizierung des Device anzubringen.

Die Vorteile der vorliegenden Erfindung sind, daß neben den üblicherweise vorhandenen Modulen, z. B. einer Pipettiereinheit, keine besonderen Automatisierungsmodule notwendig sind, so daß z. B. direkte Anwendbarkeit in Automaten wie Elecsys 1010 oder in TECAN-Pipettierstationen zur Applikation von molekular diagnostischen Bestimmungen gegeben ist. Bei Anwendung als Dichtung für PCR-cups sind alle Reaktionsgefäße beim Pipettieren von Probe und PCR-Mix verschlossen. Ein Aerosoleintrag ist daher nicht möglich. Dies gilt auch für alle weiteren Verarbeitungsschritte. Dies ist eine erhebliche Vereinfachung der manuellen PCR-Pipettierung, da kein Deckelöffnen mehr erforderlich ist. Ein Einsatz als Reaktionsgefäß in Probenvorbereitungsverfahren ist mit Vorteil möglich. Eine Zugänglichkeit für Pipettierungen mit Stahlnadeln oder Einmalpipettenspitzen ist gegeben. Mikrotitrationsplattenformate sind möglich und kostengünstig herstellbar. Im Gegensatz zum Stand der Technik ist mindestens einer der Verschlüsse selbstschließend. Ein riesiger Vorteil des erfindungsgemäßen Systems ist, daß eine kontaminationsarme Mehrfachentnahme von Flüssigkeit aus dem Gefäß selbst nach PCR möglich ist.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern:

Beispiel 1

In diesem Beispiel werden die Materialien für ein System enthaltend Elemente gemäß den Fig. 6, 9, 10, 11 und 12 beschrieben.

Im vorliegenden Beispiel wird Polypropylen (Novolen 1100 UCX mit einem Zusatz 11 NU 10 in einer Konzentration von 3,5 %) als Material für die Reaktionsgefäße benutzt. Das Additiv, das bis max. 10% zugesetzt werden kann, vermittelt eine verbesserte Wärmeleitung, so daß die Beheizung des Reaktionsgutes besonders schnell in einem Thermoblock erfolgen kann. Dies wird durch die besonders dünne Wandstärke des Reaktionsgefäßes von 0,3 mm, und die konische Form unterstützt.

Die Reaktionsgefäße fassen ein Volumen von 0,25 ml.

Das Dichtelement (2) besteht bevorzugt aus elastischem Silikonkautschuk mit einer Dicke von 1 mm, Elastosil LR 3003/40 (Wacker Chemie GmbH), das eine Elastizität von 40 shore (DIN 53505) besitzt.

Zur Erleichterung des Entnehmens oder Zupipettierens ist in diesem Fall ein Schlitz von 4 mm vorgesehen.

Das Dichtelement (3) besteht aus dem gleichen Material, ebenfalls mit einer Dicke von 1 mm.

Beispiel 2

Probenvorbereitung

Ein analoges Reaktionsgefäß mit einem höheren Volumen z. B. 1,5 ml und dem erfindungsgemäßen System kann auch zur Probenvorbereitung bei einer Nukleinsäureanalyse benutzt werden. Nach einem Protokoll von B. Vogelstein und D. Gillespie (Proceedings of Natl. Acad. Sci. USA, February 1979, Vol. 76, No. 2, pp 615 -619) sind zur Isolierung von Nukleinsäure aus Agarosegele nach Methode II verschiedene Temperierschritte bei 25° C und 37 °C notwendig. Zur Reduktion des Kontaminationsrisikos läßt sich das erfindungsgemäße System bevorzugt für eine Automatisierung des Protokolls einsetzen. In R. Boom et al. (J. of Clinical Microbiology, March 1990, pp. 495 - 503) und bei P.M. Lizardi et al (Analytical Chemistry Vol. 98, pp 116-122 (1979)) werden vergleichbare Protokolle mit Inkubationen bei 56 °C bzw. 50° C beschrieben, die mit erfindungsgemäßem System mit vermindertem Kontaminationsrisiko durchgeführt werden können. Hierbei können die Pipettierschritte mit Hilfe eines x,y,z-Pipettierroboters (Fa. TECAN, Fa. Canberra Packard) automatisch durchgeführt werden. Nach Entfernen des zweiten Dichtelementes (3) und einer festen Platzierung der Reaktionsgefäße auf der Arbeitsfläche des Pipettiergerätes, kann ohne weitere geräteseitige Zusatzelemente eine kontaminationsfreie Pipettierung erfolgen. Besonders vorteilhaft ist, daß alle Gefäße mittels Dichtelement (2) verschlossen sind und somit keine Aerosole in die Reaktionsgefäße gelangen können.

Bezugszeichenliste

- (1) Reaktionsgefäß
- (2) Dichtelement 1
- (3) Dichtelement 2
- (4) Öffnung im Dichtelement 1
- (5) Pipettenspitze
- (6) Heizblock
- (7) Deckelgegerheizblock
- (8) Halterung für Dichtelement 2
- (9) Drehpunkt für Deckelgegenheizblock zum Öffnen
- (10) Rahmen zur Halterung von Dichtelement 2

- (11) Scharnier zu Öffnen
- (12) Rahmen zum Arretieren von mehreren Reaktionsgefäßen 5
- (13) Verbreiterung zum Aufschweißen von Dichtelement 1
- (14) Nietstelle zum Verschweißen von Dichtelement 1 mit Reaktionsgefäß 10
- (15) Dichtring am Dichtelement 2

Patentansprüche

1. System zur thermischen Behandlung von Flüssigkeiten, enthaltend 15
- ein oder mehrere Gefäße,
 - einen oder mehrere innere flüssigkeitsdichte Verschlüsse für diese Gefäße, 20
 - einen oder mehrere äußere Verschlüsse, die ein oder mehrere Gefäße druckdicht verschließen können.
2. Verfahren zum Transport einer Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipettiereinheit in ein Gefäß oder aus einem Gefäß, welches mit einem inneren flüssigkeitsdichten und äußeren druckdichten Verschuß verschlossen werden kann, enthaltend die Schritte: 25
- gegebenenfalls Entfernen des äußeren Verschlusses von dem Gefäß und dem inneren Verschuß,
 - Einführen der Pipettiereinheit in das Gefäß durch den inneren Verschuß, 35
 - Entnahme einer Flüssigkeit aus dem Gefäß in die Pipettiereinheit oder Abgabe einer Flüssigkeit aus der Pipettiereinheit in das Gefäß. 40
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipettiereinheit eine Pipettenspitze aus Kunststoff ist oder enthält. 45
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Verschuß eine vorgeformte flüssigkeitsdichte Eindringstelle für die Pipettiereinheit aufweist. 50
5. Verfahren gemäß Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeit im Gefäß vor oder nach Entnahme oder Abgabe von Flüssigkeit im Gefäß erhitzt wird. 55
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der äußere Verschuß während des Erhitzens gegen das Gefäß gepreßt wird, so daß der Verschuß gasdicht ist.

7. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Pipettiereinheit nach Abschluß des Flüssigkeitstransports durch den inneren Verschuß aus dem Gefäß entnommen und das Gefäß mit dem inneren Verschuß gasdicht verschlossen wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der äußere Verschuß während des Erhitzens der Flüssigkeit mit Hilfe einer Deckelheizung erhitzt wird.
9. System zur thermischen Behandlung von Flüssigkeiten, enthaltend
- eine Vielzahl von miteinander zu einer einzigen Vorrichtung verbundenen Gefäßen,
 - ein erstes Verschußelement, mit welchem diese Vielzahl von Gefäßen gemeinsam verschlossen werden kann,
 - ein davon körperlich trennbares zweites Verschußelement, mit dem das erste Verschußelement überdeckt wird und die Gefäße verschlossen werden.

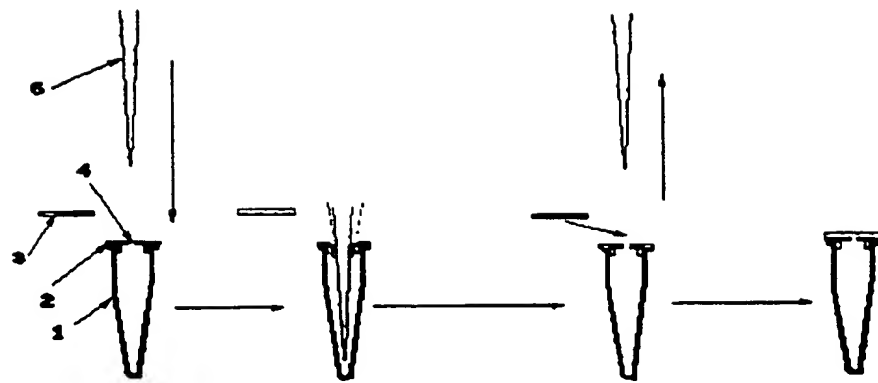


Abb. 1

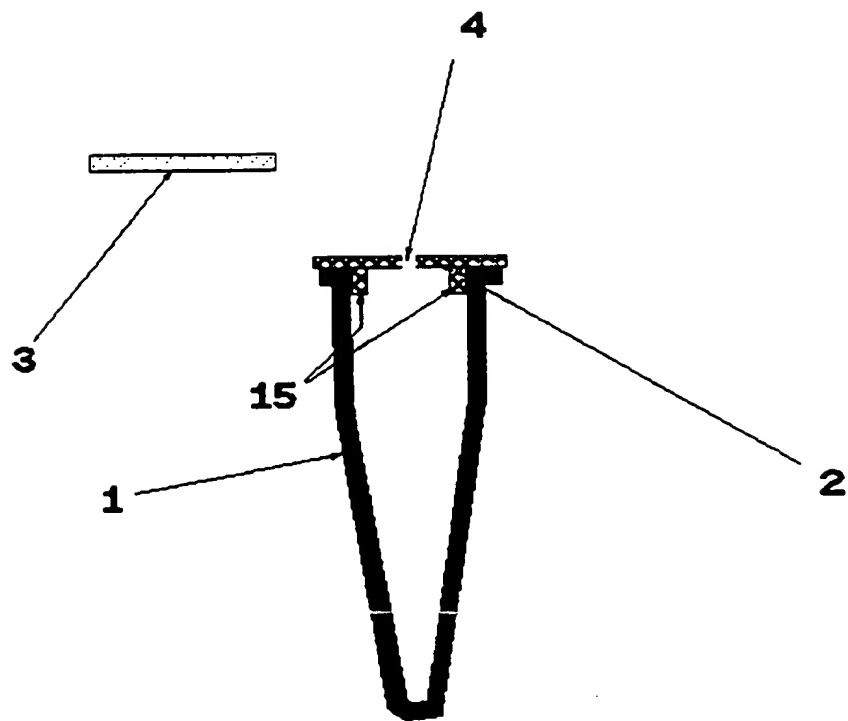


Abb. 2

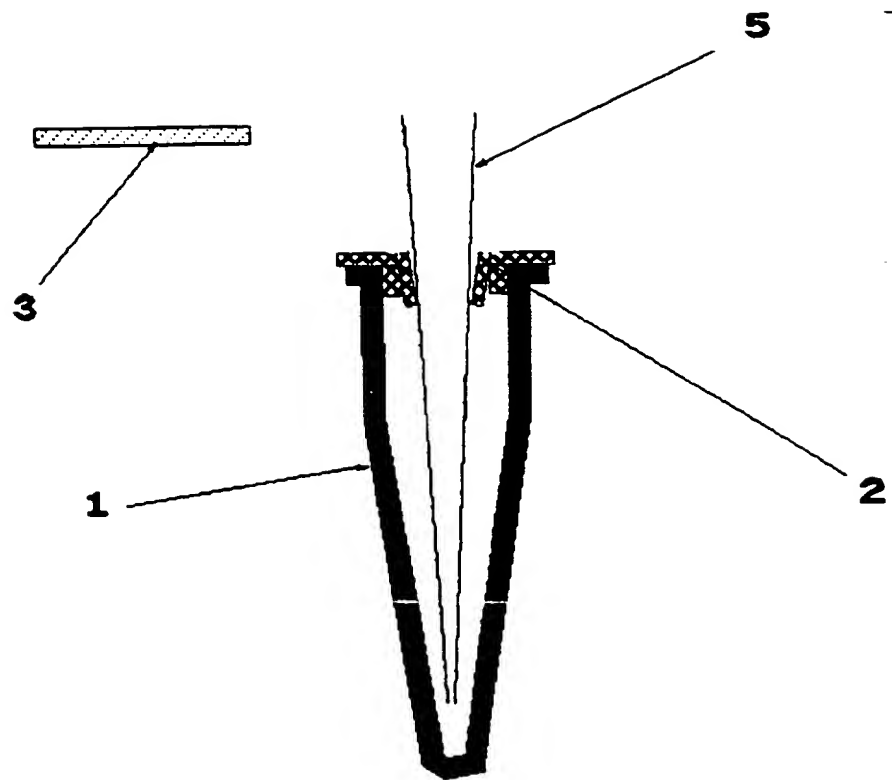


Abb. 3

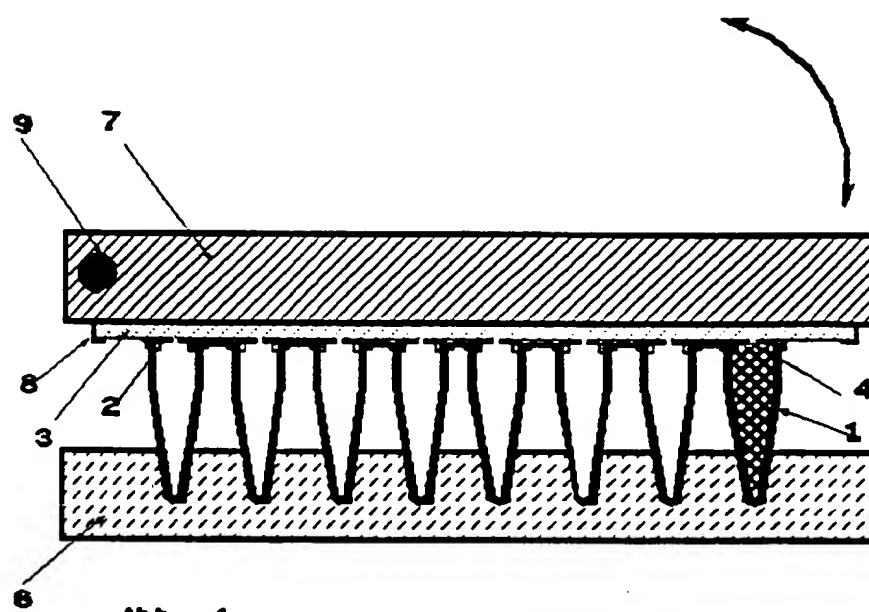


Abb. 4

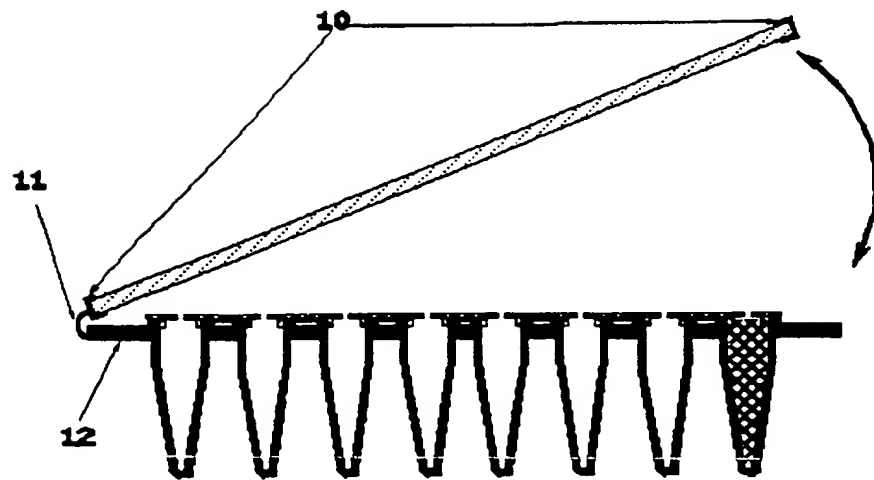
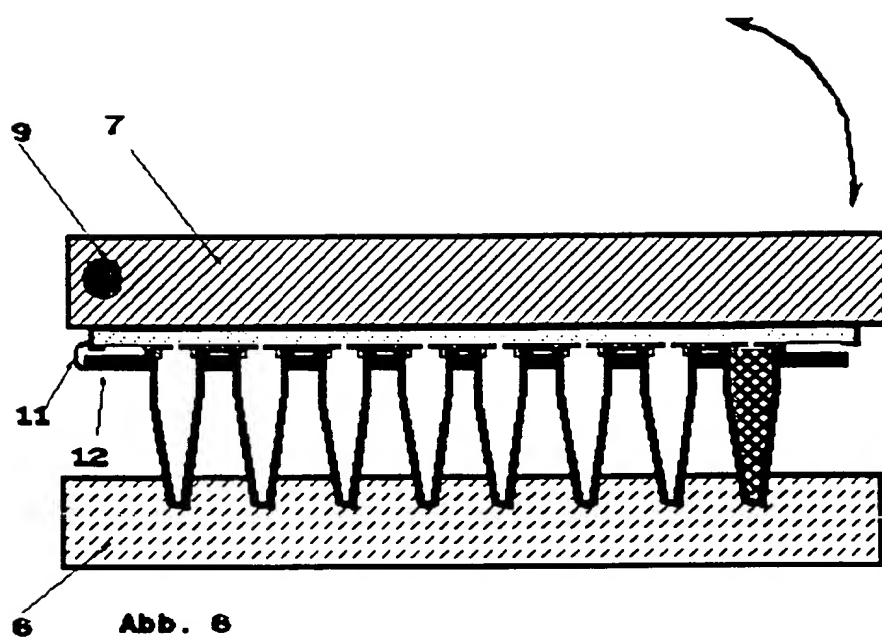


Abb. 5



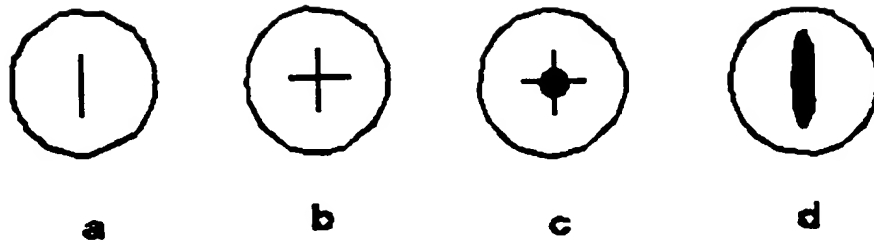


Abb. 7 a - d

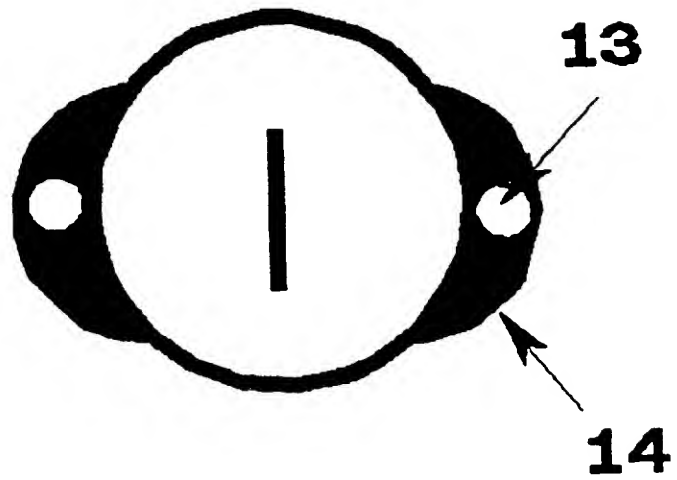


Abb . 8

Abb. 9

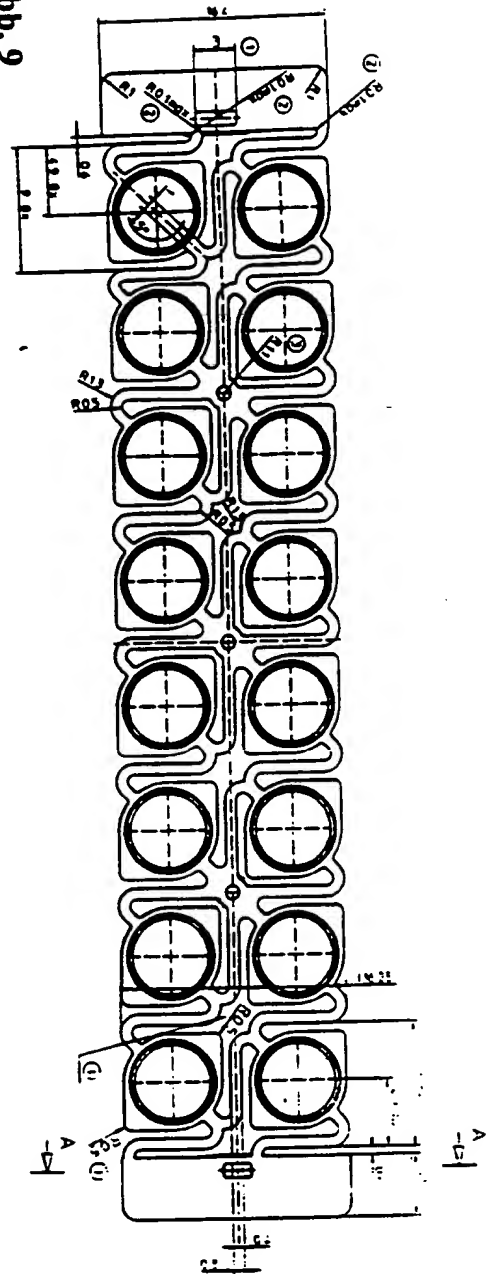
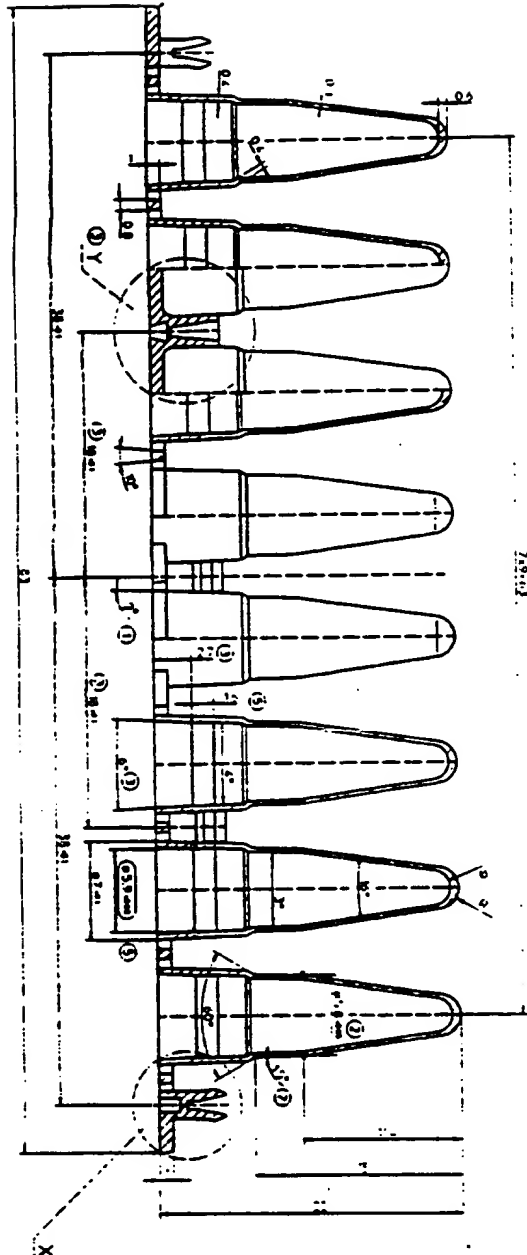


Abb. 10



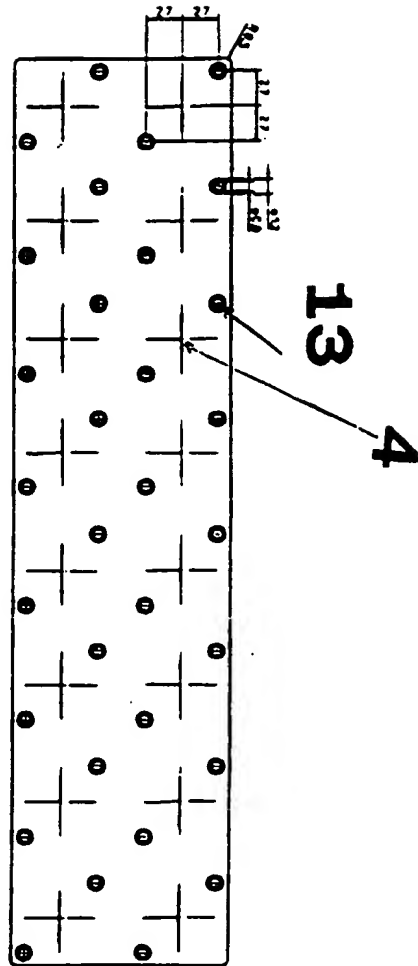


Abb. 11

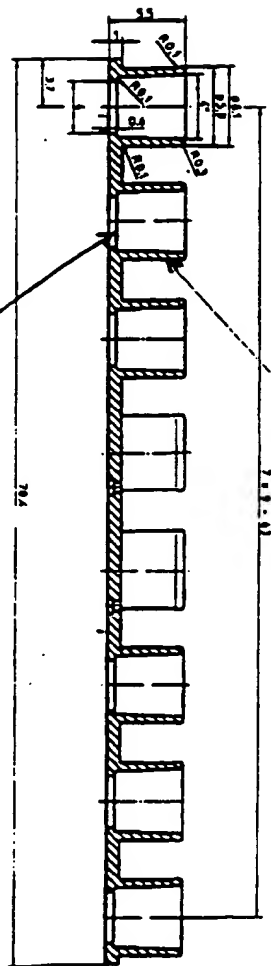
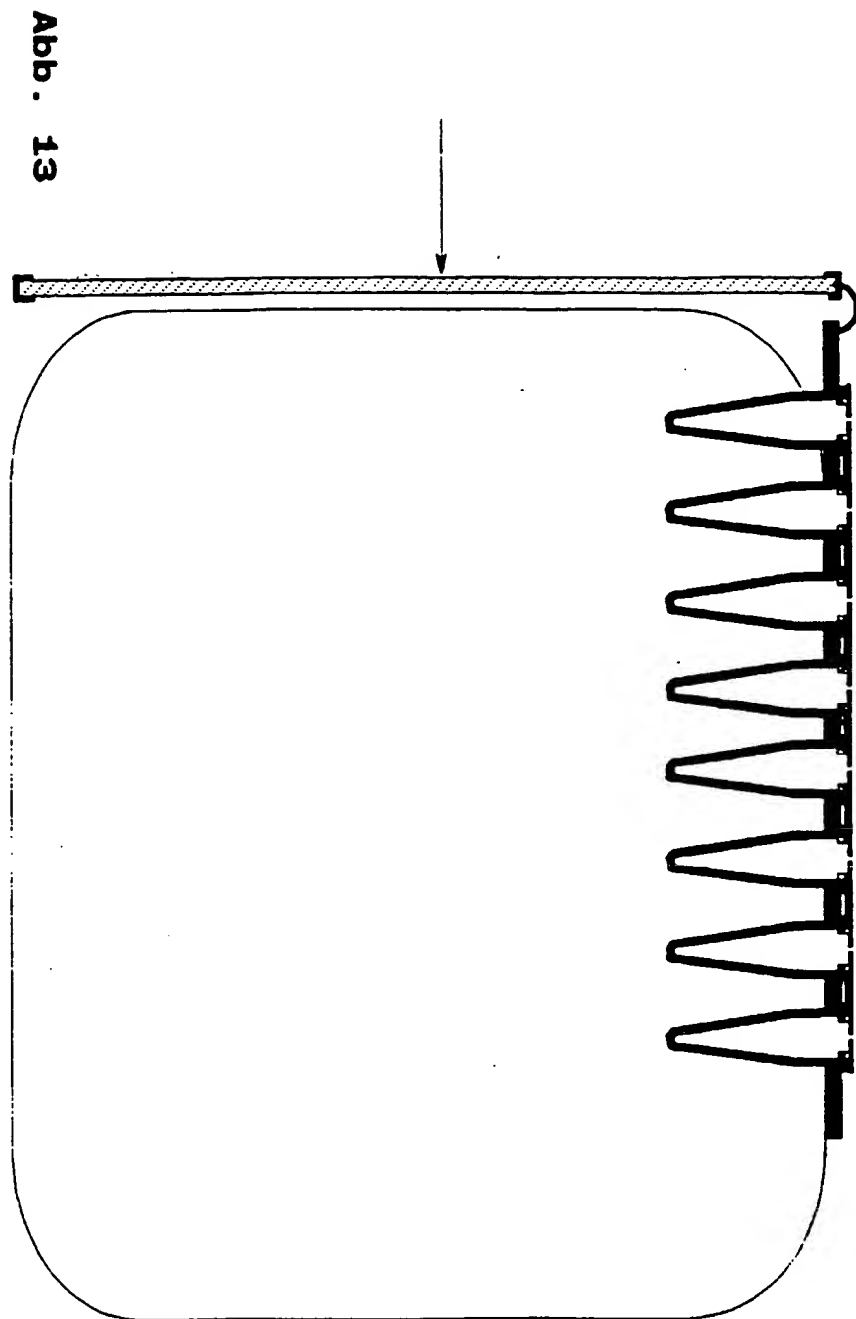


Abb. 12 4





(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 836 884 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
13.01.1999 Patentblatt 1999/02

(51) Int. Cl.⁶: **B01L 3/00**, **B01L 7/00**
// C12Q1/68

(43) Veröffentlichungstag A2:
22.04.1998 Patentblatt 1998/17

(21) Anmeldenummer: **97118138.3**

(22) Anmeldetag: **18.10.1997**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV RO SI

(71) Anmelder:
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder: **Bienhaus, Gerhard, Dr.**
82407 Wielenbach (DE)

(30) Priorität: **21.10.1996 DE 19643320**

(54) System zur kontaminationsfreien Bearbeitung von thermischen Reaktionsprozessen

(57) Ein System mit Zweikomponentendichtung aus einem inneren flüssigkeitsdichten Dichtelement (2) mit einer Öffnung (4) und einem äußeren, druckdichten Dichtelement (3) und einem Reaktionsgefäß (1) ist besonders geeignet zum Transport von Flüssigkeiten in einem solchen System sowie Temperaturbehandlungen in ihm.

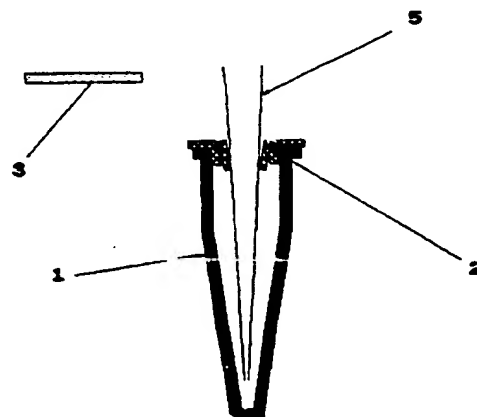


Abb. 3

EP 0 836 884 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 11 8138

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	WO 92 20449 A (MEDICAL ROBOTICS INC) 26. November 1992 * Seite 6, Zeile 18 - Zeile 28; Anspruch 7 * * Seite 6, Zeile 30 - Seite 7, Zeile 10 *	1,2,4	B01L3/00 B01L7/00 //C12Q1/68
D,X A	WO 83 01912 A (LABSYSTEMS OY) 9. Juni 1983 * Seite 2, Zeile 17 - Zeile 25 * * Seite 5, Zeile 8 - Zeile 35; Abbildungen 4-6 *	1,2 9	
X	* Seite 5, Zeile 21 *	1	
X	DE 90 06 079 U (BETHKENHAGEN ET AL.) 13. September 1990 * Seite 6, Absatz 2 - Seite 7, Absatz 2; Abbildungen 4-7 *	2	
A	WO 95 27196 A (SANADI ASHOK R) 12. Oktober 1995 * Seite 3, Absatz 2 - Absatz 3; Abbildungen * * Seite 10, Zeile 9 - Zeile 23; Abbildung 1 * * Seite 15, Absatz 2 * * Seite 18, Absatz 2 - Seite 19, Absatz 1; Abbildung 6 * * Seite 20, Zeile 5 - Zeile 16 *	5-9	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			B01L
D,A	EP 0 642 828 A (HOFFMANN LA ROCHE) 15. März 1995 * Abbildungen 4,5,8,10 *	5-9	
A	WO 95 20527 A (INNERVISION INC) 3. August 1995 * Seite 1, Zeile 17 - Seite 3, Zeile 4; Abbildungen * * Seite 14, Zeile 13 - Seite 15, Zeile 6; Abbildungen 11,7 *	1	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abchlußdatum der Recherche 24. November 1998	Prüfer Hocquet, A
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A technologischer Hintergrund O nichtschriftliche Offenbarung P Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung eingeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03 82 (P4/C20)

Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

011802031

WPI Acc No: 1998-218941/199820

XRAM Acc No: C98-069330

Fluid sample heat reaction system - has inner and outer closure for each vessel to allow pipette penetration into each vessel without damage and free of contamination

Patent Assignee: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (BOEF); ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (HOFF)

Inventor: BIENHAUS G

Number of Countries: 024 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 836884	A2	19980422	EP 97118138	A	19971018	199820 B
DE 19643320	A1	19980423	DE 1043320	A	19961021	199822
JP 10132713	A	19980522	JP 97287419	A	19971020	199831

Priority Applications (No Type Date): DE 1043320 A 19961021

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 836884	A2	G	18	B01L-003/00	
-----------	----	---	----	-------------	--

Designated States (Regional): AL AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI
LT LU LV MC NL PT RO SE SI

DE 19643320	A1	17	B01L-003/00
-------------	----	----	-------------

JP 10132713	A	9	G01N-001/00
-------------	---	---	-------------

Abstract (Basic): EP 836884 A

System to apply a heat reaction to liquids has at least 1 vessel, with at least 1 inner fluid-tight closure. At least 1 outer closure can give a pressure seal to the vessels.

Also claimed is an operation to carry the liquid through a pipette unit, which can be given inner and outer seals. The outer seals are removed from the vessel(s), and the pipette is inserted through the inner seal(s). The liquid is extracted from the vessel(s) into the pipette unit, or a liquid is discharged from the pipette system into the vessel(s).

USE - The assembly is for heat reaction of liquids, free of contamination, especially for molecular diagnostic analyses with sample preparation and amplification. It is for applications such as the detection of haemoglobin using potassium cyanide. The liquids being handled can be serum, buffy coat, plasma and their derived fluids, fluids developed by a nucleic acid amplification process, and also fluids containing reagents to prepare or amplify the components of sample fluids.

ADVANTAGE - The vessel closure is effective in sealing the contents, when the vessel is heated, but is weak enough to allow penetration by a plastics pipette point without damage.

Dwg.0/13

Title Terms: FLUID; SAMPLE; HEAT; REACT; SYSTEM; INNER; OUTER; CLOSURE; VESSEL; ALLOW; PIPETTE; PENETRATE; VESSEL; DAMAGE; FREE; CONTAMINATE

Derwent Class: B04; D16; J04

International Patent Class (Main): B01L-003/00; G01N-001/00

International Patent Class (Additional): B01L-007/00; C12Q-001/68;

G01N-001/28
File Segment: CPI

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.